

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

大腸菌における
DNA 複製開始制御機構に関する研究

Molecular Regulatory Mechanisms of
DNA Replication Initiation
in *Escherichia coli*

申請者

藤川	乃り映
Norie	Fujikawa

--

2009 年 2 月

原核生物からヒトにいたるまで、すべての生物は1個の細胞が分裂して2個の細胞になるのに先立ち、自身の染色体DNAを複製する必要がある。染色体DNAの複製は、染色体上の複製起点と呼ばれる特定領域から開始され、DNAポリメラーゼをはじめとして多くのタンパク質が複製起点に呼び込まれることにより開始される。複製された二本鎖DNAは、細胞分裂により2つの娘細胞に均等に分配されて遺伝情報を伝えていくが、DNA複製は1回の細胞分裂につき1回だけ行われ、2回以上の過剰な複製が起こらないように厳密に制御されている。DNA複製の異常は、遺伝子の変異、細胞内の染色体数異常などを引き起こし、細胞のがん化や遺伝病の原因となることもある。そのため、染色体DNAの複製開始およびその制御の基本メカニズムを明らかにすることは、非常に重要である。

大腸菌の染色体DNA複製は、245 bpからなる *oriC* と呼ばれる複製起点から開始される。染色体DNAが複製されるためには、複製開始タンパク質DnaAが、複製起点にリクルートされることが必須である。DnaAはATPと結合した時のみ複製を開始し、ATPが加水分解されてADP結合型になることで、DnaAは不活性化する。DnaAによる染色体DNAの過剰複製抑制機構としては、このDnaA自身の不活性化（RIDA制御系）と細胞内DnaA量の調節がある。また、大腸菌の染色体DNAは通常メチル化されているが、複製開始直後の新生鎖はメチル化されていないため、複製後しばらくの間はヘミメチル化状態になっている。このヘミメチル化状態の *oriC* 領域に結合するタンパク質として、SeqAが発見された。このSeqAタンパク質がヘミメチル化状態の *oriC* 領域に結合することにより、染色体DNAの再複製開始が抑制される。このようなメカニズムを介して、染色体DNAの過剰複製が制御されているが、その詳細な分子機構に関してはいまだ解明されていない。したがって、*oriC* 結合タンパク質であるDnaAとSeqAのDNA認識機構を明らかにすることは、DNA複製のメカニズムの解明において大変重要な知見を与えると考えられる。

以上のような観点から、本論文では大腸菌のDNA複製の制御に関わる2つの因子、DnaAとSeqAに着目し、それらのDNA結合メカニズムの解明に焦点を当てて解析を行った。本論文では、まず複製開始因子であるDnaAのDNA結合ドメインと *oriC* DNAとの複合体の再構成に成功し、単結晶を作製してX線結晶構造解析法によりその複合体の立体構造を決定した。そして、DnaAの配列特異的DNA結合の分子機構を原子分解能で解明した。次に、複製開始の負の制御因子であるSeqAの機能ドメインを、欠失変異体群を用いた生化学的手法により明らかにした。そして、同定したSeqAのDNA結合ドメインとヘミメチル化DNAとの複合体の結晶化に成功し、X線結晶構造解析法によりその複合体の立体構造を解明した。また、SeqAのDNA結合ドメインが、特殊なミスマッチを有するSeqA認識配列DNAに結合することを見いだし、SeqAとミスマッチDNAとの複合体についても立体構造決定に成功した。そして、これまで不明であったSeqAのヘミメチル化DNA認識のメカニズムを明らかにした。本論文では、これらの解析

結果に基づいて、DNA複製開始の制御メカニズムについての新たなモデルを提案している。以下に、本論文の各章の概要を述べ、評価を加える。

第1章は序論であり、DNA複製の重要性と、原核生物における複製開始メカニズムについて記述されている。本研究において研究対象としているDnaAおよびSeqAについて、これまでの先行研究によって議論されているそれらによる大腸菌染色体の過剰複製の制御機構について解説することで、本研究における背景と目的について述べている。

第2章では、DnaAについての解析結果および考察がなされている。まず、DnaAのDNA結合領域であるドメインIV(374-467)とDnaA結合DNA配列(DnaA box)を含む13 bpのDNAとの複合体の再構成を行い、その複合体の単結晶を得た。そしてDnaAドメインIVとDnaA box複合体の立体構造を、X線結晶構造解析法によって決定することに成功した。今回明らかにした大腸菌のDnaAドメインIV-DNA複合体構造と、すでに結晶構造解析が行われていた*Aquifex aeolicus*のDnaAドメインIII-IV部分の構造を重ね合わせたモデルを作成することにより、これまでに決定されていたDnaAドメインIII-IVの立体構造におけるドメインの相対配置に問題があることを明らかにした。すなわち、既知の構造では、DnaAドメインIII-IVはDNAと立体障害によって結合することができないことが判明した。この事実は、ドメインIIIとドメインIVの位置関係が、DNA結合の際にダイナミックに変換することを示唆した。

また、大腸菌のDnaAドメインIVがDnaA box DNAの主溝と副溝の両方において、水素結合とファン・デル・ワールス結合によって塩基配列を認識していることを明らかにし、本研究ではじめて、DnaAのDnaA box配列の認識メカニズムが解明された。さらに、DnaAが結合することにより、DNAが約30°湾曲されることを示した。これらの結果に基づいて、DnaAの*oriC*領域での複製開始機構のモデルを提案している。本研究で得られた新発見は、複製開始反応のメカニズムの理解に重要な知見として高く評価することができる。

第3章では、SeqAについての解析結果および考察がなされている。この章での内容は大きく2つに分けられる。まず前半に大腸菌SeqAの機能ドメイン解析について述べており、SeqAのN末端側1-59アミノ酸領域が多量体形成、C末端側71-181アミノ酸領域がDNA結合を担う機能ドメインであることをはじめて明らかにしている。また、SeqAはメチル化アデニンの相補鎖にグアニンを持つヘミメチル化ミスマッチDNAにも特異的に結合できることを新たに見いだしている。SeqAの機能ドメイン解析は、引き続き行われた立体構造解析のための基盤研究ともなっており、重要な技術的進歩として評価に値する。

後半には、SeqAのドメイン解析によって得られた知見をもとに、SeqAのDNA結合ドメイン(SeqA₇₁₋₁₈₁)と、ヘミメチル化DNA、ヘミメチル化ミスマッチDNAとの複合体の立体構造をX線結晶構造解析によって決定することに成功し、それらの構造的特徴について述べている。結晶構造中で、SeqA₇₁₋₁₈₁は、7つの α ヘリックスと2つの β ストランドからなる新規の高次構造を形成しており、

DNAの主溝側に結合するとともに、ヘミメチル化アデニンの相補鎖であるチミン残基をプロペラ方向に歪めることを明らかにした。この現象はヘミメチル化DNAだけでなく、ヘミメチル化ミスマッチDNAにおけるグアニン残基にも引き起こされており、メチル化アデニンの相補的な対となる塩基をプロペラ方向に歪めるといふ、SeqAに特徴的な新規のDNA結合様式を発見した。また、SeqAが特徴的なループ構造(L3 loop)によって、ヘミメチル化G-A-T-C配列を特異的に認識する機構を明らかにするとともに、SeqA変異体を用いた生化学的な解析により、L1ループもDNA結合に重要であることを示した。SeqAはヘミメチル化DNA特異的に結合し、フルメチル化DNAにはほとんど結合しないことがわかっている。SeqAは水分子を介した水素結合により、メチル化アデニンのN6メチル基を認識しているが、フルメチル化DNAに結合した場合のモデルを作成することで、フルメチル化DNAではこの水分子が立体障害により排除され、SeqAのDNA結合が弱くなることを示し、SeqAがフルメチル化DNAへの結合親和性が低下する理由を本研究ではじめて明らかにしている。これは、SeqAによるDNA複製制御機構において大変重要な知見であり、高く評価できる。

第4章は考察であり、DnaAとSeqAの*oriC* DNAとの複合体構造とその機能との関連について議論し、細胞内でのDnaA、SeqA、*oriC* DNAの相互作用とその役割について述べている。DnaAとSeqAの*oriC* DNAに対する相反する役割について考察し、今回決定した構造中でみられた複合体中のDNA構造の変化が、実際にどのように複製開始制御に影響を及ぼしているのかについて詳細に議論している。

以上、本論文は、大腸菌のDNA複製制御機構に関わるタンパク質、DnaAとSeqAについて解析しており、SeqAの機能ドメインを明らかにするとともに、DnaAとSeqAの*oriC* DNAとの複合体構造を明らかにし、DNA認識機構について詳細に解明したものである。これらの研究を通して、実際に大腸菌内でこれらのタンパク質がどのようなメカニズムでDNA複製を制御しているのかを深く掘り下げて考察している。DnaAとSeqAの*oriC* DNA認識機構をはじめて明らかにした本論文の成果は、DNA複製開始の制御機構の理解のために重要な知見を与えており、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値のあるものと認める。

2009年2月

審査員

(主査) 早稲田大学教授	博士（学術）（埼玉大学）	胡桃坂 仁志
早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	宗田 孝之
早稲田大学准教授	博士（理学）（京都大学）	岡野 俊行
理化学研究所上席研究員	理学博士（東京大学）	柴田 武彦